



## DIABETES METAALOXANICA EN EL PERRO

BERNARDO A. HOUSSAY, REINALDO F. BRIGNONE  
y PEDRO MAZZOCCO

(Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas de Bs. Aires)

La acción del aloxano sobre la glucemia del perro se desarrolla en tres fases o etapas consecutivas; a) en la fase primera, que es la más corta, se produce una hiperglucemia inicial que dura pocas horas; b) en la segunda fase la glucemia llega hasta el nivel normal y luego se produce una hipoglucemia; c) en la tercera fase se instala una hiperglucemia diabética franca que en gran número de casos suele perdurar, constituyéndose entonces una diabetes permanente.

En un trabajo anterior se estudió (Houssay, Orías y Sara, 1945), el mecanismo de la fase hiperglucémica inicial y de la fase hipoglucémica secundaria. En este trabajo se explican las características y el mecanismo de la tercera fase, o sea de la hiperglucemia diabética. Esta última ha sido obtenida primeramente por Brunschwig y sus colaboradores (1943), Goldner y Gomori (1943) y luego por varios experimentadores indicados en la bibliografía final de este trabajo.

### PARTE EXPERIMENTAL

*Técnicas empleadas.* — Los experimentos se realizaron en perros, la mayoría machos, de peso variable, generalmente entre 5 y 10 kg, a los cuales se inyectó el aloxano por la vena safena externa, sin anestesia general, en solución al 1 % en sol. de cloruro de sodio 8 g/1. Los animales se alimentaron con carne bovina cruda y agua a voluntad. Se mantuvieron en jaulas de metabolis-

mo para recoger la orina, en la cual se valoró la glucosa (método de Benedict), el nitrógeno total (método de Kjeldahl) y los cuerpos cetónicos totales (según Van Slyke), calculándose las cantidades eliminadas por kg y día. La glucemia se determinó diariamente en sangre recogida de una pequeña incisión del borde de la oreja, por la técnica de Hagedorn y Jensen modificada por Somogy. El nitrógeno no proteico de la sangre se valoró por desalbuminación y ataque según Folin y Wu, con destilación por aereación y colorimetría con reactivo de Nessler.

Se emplearon perros con el páncreas entero o bien reducido quirúrgicamente, dejando sólo 3 a 4 g, bien cicatrizados y en buen estado general y normoglucémicos. Las hepatectomías se practicaron con la técnica de Kepinov y Petit - Dutailis (1927). Las demás operaciones se realizaron con las técnicas habituales en este Instituto.

## RESULTADOS

FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA TOXICIDAD. — *Velocidad de inyección.* — La velocidad de inyección tiene enorme importancia, por lo que se determinó cuidadosamente en cada experimento, siendo casi siempre de 2 a 3 cm<sup>3</sup> por segundo de solución al 1 %, por la vena safena externa. Se comprobó que sin la inyección lenta la acción es inconstante o no se produce efecto alguno. Esto se debe a la destrucción rápida del aloxano, que le impide alcanzar en la sangre la concentración necesaria para lesionar los islotes de Langerhans. Se explica así que con una inyección lenta en 8 a 10 minutos, dosis tan altas como ser 75 mg/kg, no producen la diabetes.

*Acción de la dosis.* — En animales no inyectados previamente con aloxano, administrándoles rápidamente 100 a 200 mg/kg por vía endovenosa, se puede observar: a) a veces edema agudo del pulmón; b) a menudo ictericia por hepatosis grave; c) casi siempre uremia que produce la muerte; d) diabetes. Con la dosis de 75 mg/kg se volvieron diabéticos 28 (93 %) de los 30 perros inyectados; de los 28 diabéticos vivieron 8 más de una semana, o sea 11, 27, 31, 36, 40, 70, 88 y 249 días, mientras que 20 de los diabéticos (74 %) murió en la primera semana con síntomas de diabetes urémica. No hubo ninguna diabetes pasajera.

La dosis de 50 mg/kg resultó la más conveniente, en inyección rápida en 20 a 45 segundos, pues produjo diabetes en 70 animales (79 %), mientras que no apareció en 19 (21 %), (ver tabla 4). Veinte animales vivieron más de una semana y no se emplearon en otros experimentos, sobreviviendo 8, 8, 9, 9, 17, 26, 26, 29, 30, 30, 38, 41, 42, 56, 65, 65, 66, 80 y 134 días. Los inyectados con 40 mg/kg fueron 35 animales, de los cuales tuvieron diabetes 16 (45 %) mientras que faltó en 19 (55 %) (ver tabla 4). Con 30 mg/kg sólo se observó la diabetes en 3 de los 15 perros inyectados (20 %) y con 25 mg/kg sólo en 1 de los 12 inyectados (8 %).

Los datos de la tabla 1 corresponden sólo a los primeros lotes de animales estudiados al mismo tiempo que los perros con pancreatometomía parcial. Los de la tabla 4 son más completos.

Como no se han inyectado al perro dosis superiores a 200 mg/kg, lo que es difícil porque provocan edema agudo del pulmón, no se sabe si en este animal las dosis altas producen síntomas nerviosos o convulsivos, como los que se observan en el sapo, la rata y otras especies. No se consideran como tales los síntomas de asfixia de los perros que tuvieron edema pulmonar.

TABLA 1

*Dosis diabética de aloxano en perros testigos (con páncreas entero) o pancreatoprivos parcialmente (páncreas reducido aproximadamente a 14 % o sea un séptimo de su masa)*

Aloxano mg/kg	Perros	Diabetes permanente	Diabetes pasajera	No diabéticos	% de diabéticos
75	Testigos	13	Número de animal		93
	Pancreatopr.	11	0	0	100
50	Testigos	19	3	7	65
	Pancreatopr.	7	1	3	64
40	Testigos	3	0	8	28
	Pancreatopr.	4	2	9	27

*Papel de la pancreatometomía parcial.* — La reducción de la masa pancreática, por una operación quirúrgica previa, aumenta fuertemente la sensibilidad de los perros a la acción diabética del extracto de hipófisis y de la tiroides; pero, sin embargo, no

aumenta apreciablemente la sensibilidad al aloxano. Se emplearon nueve animales pancreatoprivos desde mucho antes (18 a 22 meses); los demás fueron operados 20 a 30 días antes de la inyección; todos eran normoglucémicos. La acción diabetógena del aloxano fué idéntica en los perros con páncreas entero y en los perros con páncreas reducido quirúrgicamente (tabla 1). Con 50 mg/kg hubo 64 % de diabetes permanente en ambos grupos de animales y las supervivencias fueron parecidas.

No hubo diferencias de sensibilidad apreciables entre los pancreatoprivos operados recientemente y los operados más de un año y medio antes.

*Papel de la médula suprarrenal.* — A un perro se le extirpó la médula suprarrenal izquierda y toda la glándula suprarrenal derecha y luego se le practicó una pancreatectomía subtotal; este animal quedó diabético al inyectarle, 22 meses más tarde, una dosis de aloxano de 25 mg/kg, siendo el único animal que quedó diabético con tal dosis.

*Papel de la paratiroides.* — Dos perros fueron inyectados con 75 mg/kg de aloxano, estando ya con síntomas de tetania al cabo de uno y dos días respectivamente después de la extirpación de las tiroides y paratiroides. En ambos se produjo la diabetes aloxánica durante la tetania y murieron al cabo de 3 y 4 días de la extirpación tiroparatiroidea. Otro perro fué tratado con lactato de calcio, 1 g/kg día por boca, mitad a la mañana y mitad a la tarde. Se le inyectó 50 mg/kg de aloxano y tuvo diabetes. En dos ocasiones se suspendió el tratamiento cálcico y se reanudó al producirse la tetania. En ningún momento varió la hiperglucemia diabética y murió a los 16 días de la inyección.

*Acción de la hipoglucemia e hiperglucemia iniciales.* — La inyección del aloxano (50 mg/kg) produjo la diabetes al ser practicada a perros con hipoglucemia insulínica (a la hora de recibir 2 unidades por kg por vía endovenosa) o bien con hiperglucemia provocada por inyección endovenosa de 2 g/kg de glucosa practicada 2 a 5 minutos antes. La falta de acción preventiva de la hipoglucemia provocada por la insulina o floridzina fué ya señalada por Goldner y Gomori en 1944.

*Acumulación de efectos.* — La dosis de 40 mg/kg administrada por vía endovenosa una sola vez produjo diabetes en 16 perros de los 35 inyectados, o sea que se obtuvo en 45 % y faltó



en 55 % del total. La diabetes fué permanente en 31 % del total de los animales seguidos más de 10 días (5/16). Esta misma dosis repetida una vez por día hasta aparición de una hiperglucemia neta superior a 1,5 g/l, produjo la diabetes en 6 de los 7 perros tratados, o sea en 85 % de los casos (tabla 2), observándose glucemias altas entre 2,21 y 3,28 g/l. De los 7 animales hubo 3 (43 %) que murieron diabéticos al cabo de 5, 6 y 8 días. Otros 3 (43 %) tuvieron diabetes pasajeras, que sólo duraron 5, 5 y 8 días después de interrumpir las inyecciones de aloxano, volviendo luego la glucemia al nivel normal, en el cual se mantuvo. Un solo perro resultó resistente a 10 inyecciones consecutivas de 40 mg/kg día.

T A B L A 2

*Acumulación de efectos con dosis diarias de aloxano (40 mg/kg por vía endovenosa)*

<i>Número del perro</i>	<i>Días de inyección</i>	<i>Diabetes producida</i>	<i>Duración</i>	<i>Muerte en días</i>
102	10	pasajera	5	—
120	4	pasajera	5	—
121	6	permanente	8	8
128	4	pasajera	8	—
129	10	no hubo	—	—
130	3	permanente	5	5
131	10	permanente	6	6

La acción acumulativa parece clara en el perro. La hemos observado en forma muy demostrativa en la rata y otros investigadores la han comprobado en el conejo.

*Aumento de resistencia.* — Algunos animales son naturalmente resistentes al aloxano de modo que no presentan la hiperglucemia diabética. Esto se observa con la dosis de 75 mg/kg en 14 % de los inyectados y con 50 mg/kg en 34 %.

Además pudo provocarse un aumento de la resistencia, en buen número de perros normales, adquirida mediante inyecciones pe-

riódicas de dosis crecientes de aloxano, practicadas a intervalos convenientes, o sea de aproximadamente una semana. Las inyecciones que resultan ineficaces para elevar la glucemia aumentan frecuentemente la resistencia a una nueva inyección de nuevas dosis habitualmente eficaces.

Así la dosis de 75 mg/kg, en primera inyección produjo diabetes en 28 de los 30 perros inyectados (el 93 %); de ellos ocho vivieron de 11 a 249 días mientras que 20 murieron con diabetes urémica en la primera semana. En cambio, de los perros tratados con dosis escalonadas de aloxano (tabla 3), empezando por 30 a 40 mg/kg, al recibir 75 mg/kg sólo tuvieron diabetes 3 de 12 animales (25 %) mientras que los 9 restantes (75 %) no tuvieron diabetes ni uremia. Es decir que habían adquirido neta inmunidad el páncreas, el riñón y probablemente otros órganos.

Al llegar a recibir 100 mg/kg sólo tuvieron diabetes 2 de esos perros (25 %) y faltó en 6 (75 %) que no presentaron hiperglucemia ni síntomas visibles y que sobrevivieron. Esa dosis de 10 mg/kg, en una sola inyección rápida, produjo siempre la diabetes urémica mortal.

Ya en 1945, Oya y Covián observaron que una segunda inyección de aloxano produjo efectos menores sobre la glucemia de perros previamente inyectados con la misma sustancia y que no tuvieron diabetes o que sólo presentaron una diabetes pasajera.

EVOLUCIÓN Y SÍNTOMAS DE LA DIABETES. — *Tiempo de supervivencia.* — De los perros diabéticos a consecuencia de la inyección de 40 a 50 mg/kg, una tercera parte de los animales murieron en la primera semana y en especial entre los 3 y 5 días, mientras que la supervivencia de los demás fué variable. Así, sin administrar insulina, se observaron supervivencias de: 8 días (3 perros), 9 (2 perros), 10, 15, 24, 26, 26, 27, 30, 30, 31, 36, 38, 40, 41, 42, 44, 56, 60, 65, 65, 70, 80, 88 y 134 días; otros tres animales fueron sacrificados al cabo de 79, 119 y 248 días de la inyección. Este último animal el de la supervivencia más larga, ya que vivió diabético más de ocho meses había recibido una dosis de 75 mg/kg. En total 36 de 170 perros sobrevivieron en tiempos escalonados desde 8 hasta 248 días.

*Glucemia.* — De 53 perros inyectados con 50 a 75 mg/kg de aloxano, el aumento glucémico diabético a más de 1,5 g/l se

TABLA 3

*Acostumbramiento o resistencia por inyecciones repetidas de aloxano en el perro. Dosis y días de intervalo*

Nº del perro	TUVIERON O NO DIABETES										
	30 mg/kg	días inter- valo	40 mg/kg	días inter- valo	50 mg/kg	días inter- valo	75 mg/kg	días inter- valo	100 mg/kg	días inter- valo	150 mg/kg
139	sí										
144	sí										
133	—		sí								
135			sí								
141	no	7	no	7	no	7	no	7	no		
142	no	7	no	7	no	7	sí	—			
143	no	7	no	7	no	7	no	7	no		
132	no	7	no	7	no	7	sí	—			
136	no	7	no	7	no	7	no	7	no		
41	no	13	no	10	sí	—	—	—	—		
9	—	—	no	7	no	5	no	—	—		
10	—	—	no	7	no	11	no	19	sí		
126	—	—	no	7	no	7	sí	—	—		
105	—	—	—	—	no	4	no	7	si		
93	—	—	—	—	no	12	no	16	no	9	sí
P a					no	20	no				
				20	no	12	no	7	no	7	no *
					no	20	no				
Pb				32	no	12	no	25	no	7	no

Los no diabéticos sobrevivieron sin síntomas ulteriores.

(\*) A los 7 días, con 200 mg/kg tuvo diabetes, ictericia, muerte en 3 días,

produjo en 1 día en 60 % de los casos, en 2 días en 24 %, en 3 días en 7,5 % y en varios días en 8,5 % de los casos. Estos últimos corresponden a reinyecciones de aloxano y se observaron al llegar a 75 mg/kg (3 veces) y 100 mg/kg (1 caso); la aparición tardía se produjo al cabo de 4, 7, 8 y 13 días de la última inyección de aloxano.

Las alturas máximas de la glucemia se han observado entre el segundo y sexto día después de la inyección. Sólo en algunos animales se hallaron valores de 5,3 g/l; 6,2 g/l; 7,52 g/l y 7,7 g/l; todos ellos murieron poco después. En los demás animales, o sea en la gran mayoría, se observaron niveles glucémicos más bajos, que en general se elevaron en los días que precedieron a la muerte. Las glucemias observadas habitualmente oscilaron entre 1,8 y 4,5 g/l, siendo las más comunes entre 2,0 y 3,5 g/l. Los máximos individuales observados estuvieron entre 2 y 3 g/litro en 33 % de los casos, entre 3 y 4 g/l en 38 % y sobrepasaron 4 g/l en 29 % de los animales.

La gravedad inicial de la diabetes muestra variaciones individuales, como señala Carrasco Formiguer (1944 a). La evolución de los casos se realiza en tres formas: 1º) diabetes inicial grave y mortal; 2º) diabetes permanente; 3º) diabetes pasajera. En la diabetes pasajera, se observan glucemias superiores a 1,5 g/l durante algunos días y luego un descenso que alcanza en general al nivel normal en 2 a 7 días. Tomando en cuenta los animales con supervivencias su-

T A B L A 4

*Diabetes pasajeras y total de diabetes con diferente dosis de aloxano en el perro*

<i>Dosis mg/kg</i>	DIABETES PASAJERA EN RELACION CON LA DIABETES		DIABETES EN RELACION CON EL TOTAL DE INYECTADOS	
	<i>Número de animales</i>	<i>% de diabetes pasajera</i>	<i>Número de animales</i>	<i>%</i>
40	5/16	31	16/35	45
50	3/70	4	70/89	78
75	0/28	0	28/30	93

periores a 8 días hallamos que las diabetes pasajeras son más frecuentes con las dosis más bajas de aloxano (tabla 4), mientras que las diabetes permanentes son más numerosas con las dosis más altas.

No hemos observado curaciones espontáneas al cabo de unas semanas de existir diabetes, como citan Carrasco y Formiguera (1945) y otros, lo que debe atribuirse a que inyectamos el aloxano con mayor rapidez que ellos o quizás al diferente régimen alimenticio de los perros.

MODIFICACIONES URINARIAS. — En los perros diabéticos, además de la hiperglucemia se observó glucosuria. Las concentraciones urinarias de glucosa oscilaron entre 20 y 70 g/l. La eliminación de glucosa urinaria por kg/día aumentó paulatinamente con el tiempo, aunque con oscilaciones; los valores habitualmente excretados se indican en la tabla 5. Estas glucosurias fueron en general menores que las observadas después de las pancreatectomías totales. Nuestros resultados difieren en esto completamente de los de Thorogood y Zimmermann (1945), quienes observaron mayores glucosurias en la diabetes aloxánica que en la pancreática, sin que podamos explicar la causa de la diferencia.

TABLA 5

*Eliminación urinaria de glucosa, nitrógeno y cuerpos cetónicos*

<i>Entre las semanas</i>	<i>Glucosa g/kg/día</i>	<i>Nitrógeno g/kg/día</i>	<i>Relación G/N</i>	<i>Cuerpos cetónicos mg/kg/día</i>
1ª y 3ª	0,9 a 1,5	0,4 a 0,9	—	1,4 a 23
4ª y 8ª	0,9 a 2,8	0,5 a 1,1	2 a 3,6	1,11 a 180
9ª y 12ª	1,2 a 2,8	0,5 a 1,3	2,5 a 3	2,2 a 211
Valor más común	cerca de 2	menos de 1	2 a 2,7	10 a 50

La eliminación de nitrógeno urinario no fué muy elevada, como se ve en la tabla 5. La relación glucosa/nitrógeno varió entre

2 y 3,6, predominando los valores entre 2 y 2,7. La eliminación de cuerpos cetónicos fué variable y presentó fluctuaciones, aumentando paulatinamente con el tiempo al intensificarse progresivamente la diabetes. El valor inicial normal, de 3 a 6 mg/kg día subió paulatinamente a 20-52 mg/kg/día y más tarde a 60-167 mg/kg/día.

La poliuria sólo fué intensa en un perro (800 a 1000 cm<sup>3</sup> diarios) neta en otro (400 a 800 cm<sup>3</sup> diarios), inconstante en otro (360 a 600 cm<sup>3</sup> diarios) y poco marcada en otros 7 perros (200 a 400 cm<sup>3</sup> diarios).

*Peso corporal.* — El peso corporal disminuyó progresivamente a pesar de que el apetito solía ser bueno. La caída de peso fué lenta durante la mayor parte de la evolución, pero se aceleró en la mayoría de los casos en las últimas semanas, muriendo los animales en caquexia, con pérdidas que llegaron frecuentemente a 20-35 % del peso inicial. El perro M1 que vivió diabético 248 días había perdido 25 % del peso cuando se le sacrificó. Algunos pocos animales murieron sin caídas de peso, por afecciones intercurrentes o por los tratamientos a que fueron sometidos.

*Pruebas de tolerancia a la glucosa.* — Se determinó la curva glucémica provocada por la inyección endovenosa rápida de 1g de glucosa por kg de peso corporal, en solución al 20 % en solución de cloruro de sodio al 8 %, a las 15 horas de ayuno (tabla 6). La curva glucémica observada presentó el aspecto típico de la curva diabética, o sea un aumento grande partiendo de un nivel inicial alto y, sobre todo, una caída lenta. Esto último se comprobó en 7 de 9 animales (87, 96, 102, 107, 121, 124 y M 1). En dos perros (119 y 122) diabéticos desde menos tiempo, la curva glucémica fué alta pero volvió al nivel inicial en la 1 ½ hora. Sólo en un animal (el 122) se observó un nuevo ascenso secundario a la hora y media; pero a los pocos días después ya no se observó ese ascenso en el mismo animal y hubo una curva diabética típica.

El perro 93 fué resistente al aloxano, pues no tuvo diabetes ni con 50 mg/kg ni con 75 mg/kg. Después de esas dosis su curva de tolerancia a la glucosa se mantuvo como antes de inyectarlos. Lo mismo se observó en el perro 96 que no tubo diabetes con 50 mg/kg y en el cual no varió la curva normal de tolerancia a la glucosa; más tarde recibió 100 mg/kg y quedó diabético y entonces sus curvas fueron típicamente diabéticas.

TABLA 6

*Curvas de glucemia de 8 perros diabéticos por aloxano y media de 11 normales después de la inyección endovenosa de glucosa (1 gramo por kg de peso)*

Perro	Dosis de aloxano mg/kg	Días de diabetes	GLUCEMIA G/L AL CABO DE HORAS								
			Antes	5 m	½	1	1½	2	3	4	5
119	40	13	2,85	4,65	3,49	2,95	2,77	2,85	2,47	2,57	2,57
121	40	16	1,51	—	2,93	2,49	2,29	2,07	1,79	1,79	1,61
122	50	26	3,55	4,99	3,64	3,64	4,96	4,56	4,12	3,43	3,55
122	—	42	2,74	5,16	4,50	4,06	3,62	3,34	3,21	3,08	3,06
124	50	27	2,47	4,88	4,54	3,98	3,84	3,78	3,74	3,53	3,46
96	100	57	1,99	3,27	3,09	3,05	3,05	—	2,99	2,55	2,37
96	—	68	2,32	4,36	3,56	3,16	2,98	2,68	2,68	2,49	2,47
107	50	58	2,73	3,99	3,49	3,27	3,31	3,09	3,09	3,27	3,01
102	40	79	1,19	3,00	2,14	1,96	1,92	1,85	1,80	1,69	1,21
87	40	109	2,09	3,65	2,85	2,95	2,75	2,67	2,29	2,13	2,13
M 1	75	248	2,54	4,24	3,80	3,44	3,04	3,00	2,94	2,84	2,60
Media de 11 norm.	—	—	0,86	2,70	1,70	1,04	0,89	0,88	0,79	—	—

*Sensibilidad a la insulina.* — Se determinó inyectando por vía endovenosa una unidad de insulina por kilogramo de peso (tabla 7). El descenso glucémico observado en 11 determinaciones sobre 8 perros con diabetes por aloxano es parecido, aunque algo mayor, al que se observó en perros con diabetes metatiroidea. Con la misma dosis y vía se inyectaron 9 perros en estado normal, antes de recibir el aloxano. El descenso absoluto obtenido en la diabetes

T A B L A 7

*Curva glucémica provocada por la inyección endovenosa de insulina (una unidad por kg. de peso) a perros con diabetes aloxánica*

Dosis de aloxano mg/kg	Días de diabetes	GLUCEMIA AL CABO DE HORAS							
		Antes	½	1	1 ½	2	3	4	5
50	12	1,65	0,84	1,09	1,06	1,17	1,22	1,30	1,22
—	28	2,54	1,27	0,87	0,85	0,92	0,98	1,00	1,10
40	13	2,23	0,91	0,96	0,91	0,96	0,91	1,16	1,16
40	17	1,42	0,95	0,95	0,75	0,64	0,57	0,77	1,53
50	26	2,68	1,34	1,04	1,20	1,23	1,27	1,39	1,52
—	42	2,54	1,05	0,69	0,69	0,76	0,83	1,19	1,29
50	58	2,66	2,19	1,51	1,17	0,96	0,87	0,89	1,00
100	59	1,33	0,82	0,73	0,71	0,73	0,82	0,78	0,91
—	68	1,90	0,96	0,78	0,71	0,76	0,92	1,03	1,14
40	109	1,91	0,86	0,86	0,79	0,95	0,99	1,15	1,39
75	248	2,37	1,40	1,00	0,96	0,98	0,96	1,10	1,15
Media de los 8 perros con diabetes aloxánica . . .		2,11	1,15	0,95	0,89	0,91	0,94	1,06	1,21
Media de 5 perros con diabetes metatiroidea . . .		2,75	1,32	1,02	1,00	1,00	1,02	1,15	—
Media de testigos		0,89	0,68	0,56	0,54	0,60	0,71	0,82	1,02



aloxánica (t. m. 1,22 g/l), como se observa también en la diabetes pancreática, es mayor que en los testigos (t. m. 0,35 g/l). El descenso calculado en relación con la concentración inicial, fué mayor en los perros con diabetes aloxánica (57 %) que en los testigos (39 %).

Fuó muy variable el comportamiento de los animales con diabetes provocada por el aloxano cuando fueron sometidos a un tratamiento con insulina protamina. Ocho animales murieron en hipoglucemia después de 2 a 15 días de tratamiento: con 1 unidad

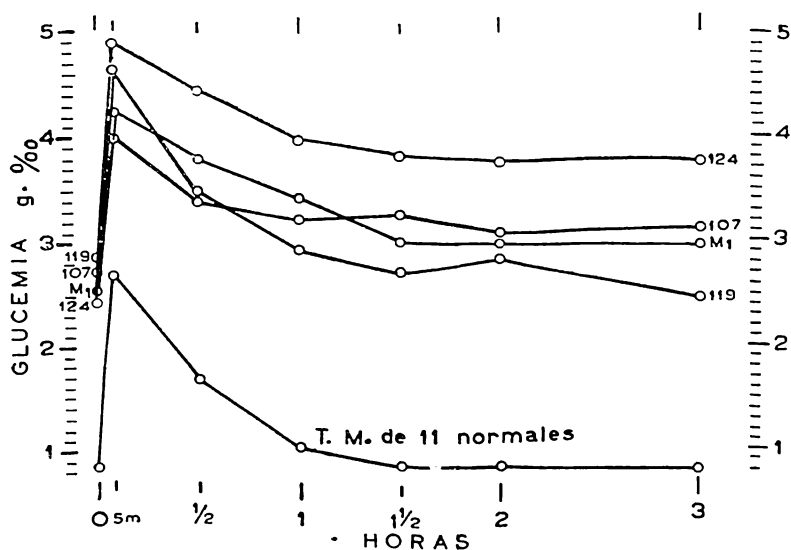


GRÁFICO 1

Curvas glucémicas después de la inyección endovenosa de glucosa 1 g/kg, a cuatro perros con diabetes por aloxano y término medio de 11 testigos

por kg y día (1 caso), 1 1/2 unidad kg/día (1 caso), 2 unidades kg/día (3 casos), 3 unidades kg/día (2 casos). Otros 6 murieron durante el tratamiento, 5 con esteatonecrosis (tabla 10) y 1 urémico (a los 3 días de recibir el aloxano). Tres perros tratados desde los 2, 3 y 1 día después de recibir el aloxano curaron de su diabetes después de 22, 4 y 16 días de tratamiento con dosis de 2 unidades kg/día. Se sacrificaron de 10, 18 y 25 días de normoglucemia para examinar histológicamente los islotes de Langerhans de páncreas.

Dos perros fueron tratados a los 36 días de su diabetes y fueron resistentes, pues sus glucemias no se modificaron durante diez días de tratamiento con dosis de 2 a 3 unidades/kg/día; murieron diabéticos más tarde, con hígado graso grande y degeneración adiposa centrolobulillar.

En 4 perros la glucemia bajó durante la administración de insulina, incompletamente en 2 y completamente en 2, al cabo de 25, 26, 45 y 34 días de tratamiento. El estado general y el peso mejoraron. Al suspender la insulina volvió la diabetes, es decir que no hubo curación.

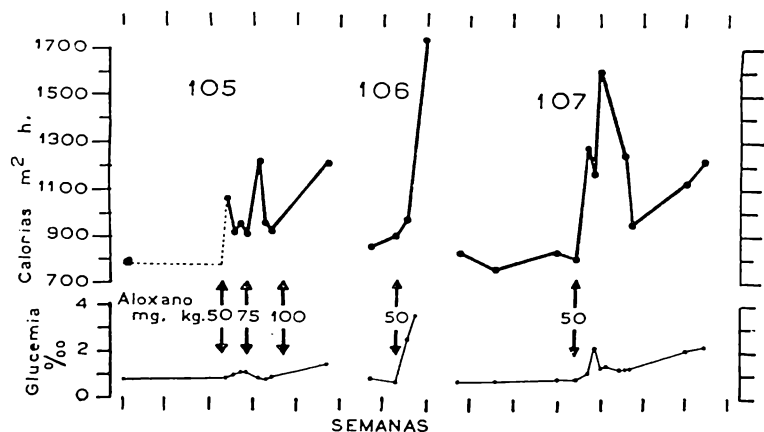


GRÁFICO 2

Modificación del metabolismo basal por inyección de aloxano en tres perros (105, 106, 107)

*Metabolismo basal.* — Se midió repetidas veces el intercambio respiratorio de cuatro perros, acostumbrados a quedarse quietos sin contención ni anestesia, empleando las técnicas habituales en este Instituto (Artundo, 1930). Las determinaciones en tres de ellos se practicaron antes y después de inyectar el aloxano; en otro perro (M 1) sólo se hicieron cuando hacía ya tiempo que tenía diabetes por aloxano (gráficos 2 y 3).

El perro 105 era bastante resistente al aloxano, pues las inyecciones endovenosas de 50 y 75 mg/kg no produjeron diabetes; sin embargo, hubo un aumento marcado y pasajero del metabolismo, verificado a las 48 horas; una última inyección de 100 mg/kg le produjo la diabetes y un aumento metabólico comprobado 7 días

más tarde, o sea antes de la muerte. Las tres inyecciones aumentaron el metabolismo, 2 sin producir diabetes y 1 con diabetes (gráfico 2).

El perro 106 tuvo diabetes ya al día siguiente, con aumento metabólico intenso a los 3 días de la inyección de aloxano (50 mg/kg), muriendo al día siguiente de la determinación (gráfico 2).

El perro 107 sólo tuvo diabetes desde 3 días después del aloxano, pero el aumento neto de metabolismo existía ya a los 2 días; este aumento siguió con fluctuaciones hasta que se sacrificó el animal a los 11 días (gráfico 2).

El perro M 1, diabético desde hacía meses y que sobrevivió en buen estado hasta ser sacrificado a los 249 días (más de 8

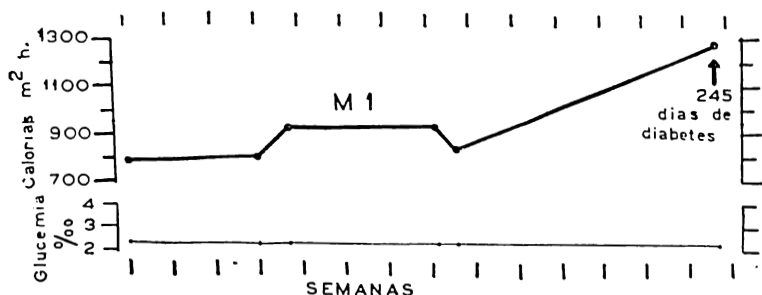


GRÁFICO 3

Metabolismo basal de un perro con diabetes prolongada por aloxano

meses), tuvo un metabolismo normal en tres determinaciones, normal un poco alto en otras dos y muy alto en la última (gráfico 3).

En todos los perros con diabetes aloxánica el cociente respiratorio osciló entre 0,66 y 0,77, siendo más frecuentes los valores entre 0,67 y 0,73.

De estas observaciones parece deducirse: a) el aloxano produce un aumento neto y pasajero del metabolismo verificado dos o tres días después de la inyección y que existió aunque el animal no estuviera diabético; b) en un animal bien diabético que vivió muy largo tiempo en buen estado, el metabolismo estuvo primero bajo, luego un poco alto y al final muy aumentado; c) en un animal diabético sólo desde el tercer día, el metabolismo se mantuvo siempre alto desde la inyección de aloxano. Esta sustancia parece producir un aumento metabólico inicial pasajero, con o

sin diabetes, y luego un aumento progresivo en relación con la intensidad de la diabetes. En este Instituto se ha comprobado que en la diabetes metahipofisaria (Houssay y Foglia, 1944) o metatiroidea (Houssay, 1944) hay también un aumento metabólico que progresa con el tiempo, al agravarse paulatinamente la diabetes.

*Sustancias minerales del plasma.* — La inyección endovenosa de aloxano no produjo modificaciones inmediatas de los elementos minerales del plasma sanguíneo, al cabo de un minuto y medio y de quince minutos, en dos perros (tabla 8).

Tres animales recibieron aloxano y quedaron diabéticos. Las modificaciones que se comprobaron fueron: aumento constante del

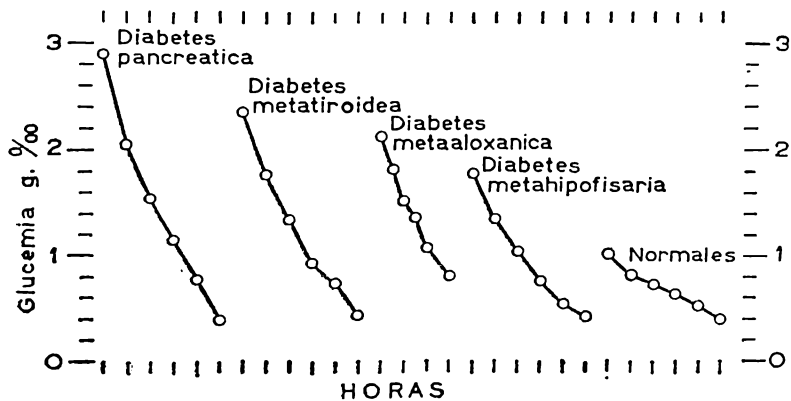


GRÁFICO 4

Descensos glucémicos por hepatectomía total en 4 perros con diabetes pancreática; 4 con diabetes metatiroidea, 5 con diabetes aloxánica (excluyendo 2 casos), 4 con diabetes metahipofisaria, 5 normales

fósforo inorgánico del plasma cuando había hiperglucemia, un ligero ascenso pasajero y dudosamente significativo del potasio entre los 21 y 27 días, no varió apreciablemente el calcio, disminuciones variables del cloro y el sodio. Estas modificaciones son las que se encuentran en las demás diabetes leves, y fueron más bien poco intensas.

*Hepatectomía.* — Se extirpó el hígado de 7 perros diabéticos por aloxano. En 5 de ellos se produjo un descenso de la glucemia como en todas las diabetes y con idéntica curva de caída (ver tabla 9 y gráfico 4), mostrando que sin hígado, el nivel glucémico no se mantiene. En los otros 2 perros hubo muy poco descenso

T A B L A   S

*Variaciones de las sustancias minerales por acción del aloxano, en  
mg/100 cm<sup>3</sup> de plasma*

<i>Fecha</i>	<i>Cl</i>	<i>P</i>	<i>Na</i>	<i>K</i>	<i>Ca</i>	<i>Glucosa</i>
Perro 143: Recibió 100 mg/kg de aloxano endovenoso						
Antes	390	3,5	385	17	10.3	93
A los 13 días	—	6,1	357	20	11.6	224
„ „ 23 „	390	6,6	363	31	10.3	214
„ „ 27 „	360	7,6	389	18	9.9	266
„ „ 36 „	375	4,9	384	18.5	10.6	222
„ „ 48 „	395	5,1	369	21	10.7	220
Perro 155: Recibió 50 mg/kg de aloxano endovenoso						
Antes	385	4	385	19	10	98
A los 6 días	384	9,8	378	19	9.8	290
„ „ 36 „	340	6	362	28	9.5	272
„ „ 25 „	340	7	379	25	9.5	280
„ „ 27 „	340	5,9	355	14	9.9	256
„ „ 48 „	360	4,6	331	18	9.6	214
Perro 171: Recibió 75 mg/kg de aloxano endovenoso						
Antes	390	5	384	20	9	74
A los 13 días	380	4,6	374	17	10.3	85
„ „ 21 „	380	6,1	380	24	11.6	147
Perro 171: Recibió 75 mg/kg de aloxano endovenoso						
Antes	380	5	374	17	10.3	85
A los 15 min	390	4,6	376	16.5	10.7	95
Perro A: Recibió 80 mg/kg de aloxano endovenoso						
Antes	380	4	384	15.3	10.5	—
Al 1 ½ min	370	5	387	17.7	11.2	—
A los 15 min	370	5,2	387	16	10.7	—

al cabo de 3 horas, lo que hace probable que hubiera disminución en el consumo periférico de la glucosa; esto último no lo hemos visto en ningún otro tipo de diabetes experimental.

TABLA 9

*Acción de la hepatectomía total sobre la glucemia de perros con diabetes aloxánica*

Dosis de aloxano mg/kg	Diabetes desde días	GLUCEMIA % AL CABO DE HORAS								
		0	½	1	1 ½	2	2 ½	3	4	5
50	5	2,13	1,90	1,59	1,34	0,91		0,79	0,45	0,38
50	5	1,36	1,15	0,95	0,86	0,70		0,47		
50	2	1,94	1,74	1,54	1,47	1,22		0,87		
75	9	2,37	1,78	1,52	1,42	1,20		0,89		
50	4	2,87	2,53	2,08	1,79	1,38	1,06			
50	4	3,53	3,50	3,08	3,10	3,02	2,92			
50	4	4,14	4,02	3,88	3,98	3,88		3,06		

ALTERACIONES ANATÓMICAS Y FUNCIONALES DE DIVERSOS ÓRGANOS. — *Alteraciones del páncreas.* — En la autopsia el páncreas tenía aspectos variados. A veces era normal, otras algo más blanco y opaco que normalmente, en algunos casos se observaban congestiones ligeras o acentuadas; con color que iba del rosa pálido al intenso, uniforme o como marmoleado alternando con partes pálidas, en 5 casos existían zonas localizadas de congestión intensa y en 3 se veían algunos puntos rojos hemorrágicos de pequeño tamaño. En algún caso de pancreatitis el color del órgano tendía al gris.

Algunos perros con pancreatectomía subtotal y uno con páncreas entero tuvieron pequeños abscesos entre el páncreas y el epipión y otros órganos que adherían al páncreas.

Llamó la atención la existencia de esteatonecrosis hallada a simple vista en 25 de los 111 perros autopsiados (22 %) (Tabla 10) y comprobada al microscopio en cortes del páncreas de 22 % de los perros que fueron examinados histológicamente.

T A B L A 10

*Casos de perros con citoesteatonecrosis después de recibir aloxano*

<i>Perro Nº</i>	<i>Aloxano mg/kg</i>	<i>Diabetes</i>	<i>Autopsia al cabo de días (¹)</i>	<i>Tratam. con insulina</i>	<i>Otros datos</i>
7	40	sí	70	no	
10	100	sí	54	no	Acumulación (ver tabla 3)
18	50	sí	40	no	Pancreatectomía parcial; extirpación de 6/7 del páncreas
20	50	sí	3	no	
34	75	sí	6	no	
39	50	sí	5	no	
89	50	sí	11	sí	Hipoglucemia
92	50	sí	57	sí	No mejoró
121	40	sí	8	no	Acumulación (ver tabla 2)
125	50	sí	6	sí	Hipoglucemia?
130	40	sí	3	no	Acumulación (ver tabla 2)
131	50	no	1	no	Acumulación (ver tabla 2)
135	50	sí	13	sí	Hipoglucemia; ingirió azúcar
142	75	sí	8	no	Diabetes tardía
151	50	sí	5	sí	
155	56	sí	56	no	
159	50	sí	3	no	Ictericia ligera
173	50	sí	12	no	2 días de diabetes; hipo- glucemia floridzínica
174	50	sí	4	no	1 día de diabetes; hipo- glucemia floridzínica

(1) De la última inyección.

Es posible que la frecuencia de la lesión sea un poco mayor, porque no se sospechó ni se buscó en las primeras autopsias. Macroscópicamente existían las típicas manchas blancas como estearina o cera, a veces sobre el páncreas y con más frecuencia debajo del peritoneo o ambos lados del páncreas, en especial a lo largo del duodeno; a veces se diseminaban a lo largo de los vasos de la cola duodenal; en algunos casos se extendía más lejos en el mesenterio y aún en el epiplón. En general las manchas eran pequeñas, de 1 a 3 mm de diámetro, pero en un caso eran más grandes y se observaban hasta debajo del peritoneo parietal del lado derecho y sobre la grasa perirrenal.

El examen microscópico fué practicado por los Dres. Cardeza y Di Pietro. Observaron pancreatitis y esteatonecrosis en 9 sobre 41 perros. Como redactarán un trabajo detallado, basta consignar que hubo lesiones de pancreatitis aguda o subaguda. Existía: a) congestión a veces muy intensa; b) edema o exudación serosa en ciertas zonas; c) lesiones necróticas del epitelio de algunos canales y a veces con efracción de los mismos y grados variables de necrosis de su pared; d) zonas de células acinosas alteradas; e) algunos focos de necrosis de acinos o de esteatonecrosis; f) en las zonas lesionadas y alrededor de los focos de esteatonecrosis había infiltración de polinucleares y otros elementos celulares.

El examen histológico de los islotes de Langerhans del páncreas de 42 perros fué practicado por los Dres. Di Pietro y Cardeza, quienes publicarán detalladamente sus comprobaciones. Lo más característico que se comprueba es una lesión casi inmediata de las células  $\beta$ , que luego van desapareciendo paulatinamente durante la diabetes, mientras que persisten y a veces aumentan tardíamente las células  $\alpha$ .

Esto se observa en todos los casos, aunque hay diferencias secundarias. Así en los perros, cuya masa pancreática se redujo quirúrgicamente, antes del aloxán, se observa una esclerosis interlobulillar e interacinososa y en general los islotes eran pequeños y estaba disminuído su número. En 3 páncreas se halló una marcada dilatación de los conductos y acinos pancreáticos, con diversos grados de lesión o atrofia de muchos acinos. En un caso se halló esclerosis e hialinización de la pared de los canales pancreáticos.

En los perros con páncreas entero y que tuvieron diabetes, la inyección de aloxano alteró siempre las células  $\beta$ . En algunos que



no tuvieron hiperglucemia, las células  $\beta$  quedaron intactas o algunas se lesionaron transitoriamente. En los diabéticos observados durante los primeros 15 días consecutivos a la inyección, las células  $\beta$  estaban siempre desgranuladas y eran generalmente pequeñas. Las alteraciones de los núcleos eran netas, aunque de aspecto variable, como ser: a) muchos estaban deformados y algunos retraídos; b) algunos eran picnóticos; c) algunos núcleos estaban agrandados; d) otros estaban bien conservados; e) en un solo caso varios núcleos estaban vacuolados; f) en un solo caso el protoplasma mostraba vacuolas perinucleares.

Entre los 20 y 75 días después de la inyección, las células  $\beta$  habían disminuido mucho, eran cada vez más escasas y desgranuladas y a veces llegaban a faltar completamente; no presentaban en general vacuolas. En cambio se hallaron algunas células  $\beta$  grandes y con vacuolas en perros con páncreas reducido y diabéticos por aloxano, que vivieron entre 8 y 9 días y no tuvieron pancreatitis. En los casos con pancreatitis las células  $\beta$  estaban grandes, desgranuladas y vacuoladas, con núcleos grandes y deformados y con tendencia a la lisis.

Las células  $\alpha$  no se alteraron, salvo en zonas de pancreatitis en que estaban hinchadas y homogéneas. En los demás casos tenían aspecto normal y se observó en algunos casos su neoformación alrededor de conductillos pancreáticos. En algunos perros que vivieron 20, 40, 61 y 75 días se hallaron islotes grandes constituidos exclusiva o casi exclusivamente por células  $\alpha$ .

El epitelio de los conductos pancreáticos estaba muy vacuolado en los perros diabéticos, en algunos pocos desde los 5 a 7 días de la inyección de aloxano y en todos desde los 38 a los 75 días. Había focos de degeneración y descamación del epitelio en las zonas de esteatonecrosis.

En los páncreas de los perros que recibieron varias dosis de aloxano y las resistieron sin tener diabetes, sin embargo se hallaron islotes pequeños, numerosos o escasos, con gran predominio de células  $\alpha$ ; las células  $\beta$ , que persistían, estaban normales o desgranuladas, esto último si la inyección de aloxano era reciente.

En los diabéticos tratados con insulina se hallaron islotes con predominio de células  $\alpha$ . A pesar de haber vuelto a la normoglucemia, había menor número de células  $\beta$ ; en dos perros, muchas estaban desgranuladas y algunas eran grandes y vacuoladas; en

otro perro (el 138), curado de su diabetes desde hacía 25 días, las células  $\beta$ , aunque escasas, tenían aspecto normal con granulaciones típicas, aunque poco abundantes.

En los perros que recibieron aloxano y luego tiroides y que llegaron a tener una diabetes metatiroidea se hallaron escasas células  $\beta$  desgranuladas. En un solo perro (el 87) se hallaron islotes grandes con sólo células  $\alpha$ ; además, en algunos acinos las células centroacinosas estaban agrandadas y multiplicadas, hecho que el Dr. Lucas ha observado con mucho mayor intensidad en el páncreas de los cobayos tratados con tiroides.

En resumen, el aloxano produce: a) alteraciones degenerativas específicas de las células  $\beta$  y luego su desaparición paulatina; b) las células  $\alpha$  se conservan y a la larga aumenta casi siempre su número; c) el epitelio de los conductos pancreáticos presenta vacuolas al cabo de algún tiempo de diabetes; d) la insulina produce normoglucemia, aunque con algunas oscilaciones, en perros con diabetes aloxánica, aunque sus células  $\beta$  no se hayan normalizado aún; esta normalización histológica se produce lentamente; e) el aloxano provoca pancreatitis agudas o subagudas y esteatonecrosis en cierto número de animales (20 a 22 %).

Goldner y Gomori (1943-1944-1945) describieron fenómenos muy semejantes a los que hemos observado. Hacen notar que las células  $\beta$  no presentan necrosis franca; lo primero que se observa es su desgranulación con achicamiento del citoplasma y nunca vacuolización ni mitosis. Los núcleos están alterados o picnóticos. Los islotes contienen células  $\alpha$  conservadas y numerosas, pareciendo aumentar de número. Fenómenos semejantes observaron Ridout, Ham y Wrenshall (1944) y Thorogood y Zimmerman (1945).

*Secreción de insulina.* — Los páncreas de los perros diabéticos por la inyección de aloxano no segregaron insulina cuando se injertaron, por anastomosis vascular, en el cuello de perros con diabetes por pancreatectomía total realizada 24 horas antes (Tabla 11). Mientras que los páncreas de perros normales corrigen la hiperglucemia diabética de esos animales, que baja a 1.20 g/l o menos en 3 a 5 horas, los páncreas de los perros con diabetes aloxánica no corrigieron en ningún caso la hiperglucemia diabética. Es interesante que uno de los perros no tenía hiperglucemia y sin embargo su páncreas al ser injertado, no segregó insulina en cantidad apreciable.

TABLA 11

*Secreción de insulina de páncreas de perros con diabetes por aloxano, injertados por unión vascular al cuello de perros pancrea-tectomizados 24 horas antes. Cloralosados. Glucemia en gramos por mil*

PANCREAS DE PERRO CON				GLUCEMIAS DEL DIABETICO INJERTADO CON EL PANCREAS									Peso del perro kg
Aloxano mg/kg	Días con diabetes	Glucemia final	Peso kg	Antes	30 m	1 h	1 y ½ h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	
50	5	1,91	6,2	2,26	1,99	1,99	2,31	2,07	2,70	3,21	2,80	3,17	11
50	5 *	1,24	3,9	2,70	2,28	1,96	1,94	1,99	2,12	1,80	2,11	2,07	15
60	4	4,10	5,5	2,39	1,96	2,14	2,13	2,24	2,43	2,13	2,01	2,20	1,9
50	4	2,78	10	3,13	2,54	2,78	3,09	2,98	2,64	3,43	3,09	3,40	8,8
50	4	2,60	10,6	1,87	2,37	1,99	1,87	3,13	3,15	1,83	1,83	3,17	10
50	63	2,54	4	2,56	2,50	2,32	2,32	2,68	2,92	3,64	3,92	4,44	12

(\*) La glucemia osciló entre 1,16 y 1,24, o sea, no hubo diabetes en este perro.

Las anastomosis se practicaron uniendo con cánulas de Payr la arteria carótida del diabético pancreático a la arteria celiaca del duodeno-páncreas del inyectado con aloxano. La vena porta del duodeno-páncreas se unió a la vena yugular del diabético pancreático.

Este método no revela la secreción de cantidades pequeñas de insulina, como demostraron Houssay, Foglia y Smyth (1941). Pero es evidente que los páncreas de los animales cuyos islotes fueron lesionados por el aloxano, no segregan insulina o sólo cantidades pequeñas no demostrables por el método empleado.

*Alteraciones renales.* — Los perros inyectados con 75 mg/kg de aloxano endovenoso, presentan casi siempre una diabetes urémica generalmente mortal en pocos días, en la que se observa un aumento paulatino del nitrógeno no proteico de la sangre. Con 50 mg/kg hubo aumento del nitrógeno no proteico, pero generalmente fué pasajero. Con 40 mg/kg no se observó en 8 casos estudiados. En los animales en que el aumento de nitrógeno no proteico fué pasajero, llegó al máximo entre los 3 y 8 días y luego volvió normal entre los 5 y 10 días de la inyección. Cuando el aumento llegó a 130-185 mg/100 cm<sup>3</sup>, casi todos los animales murieron urémicos.

En la autopsia de los animales muertos en los primeros días, el corte del riñón tenía un color más pálido que lo normal, blanquecino o amarillento o lila pálido. La cortical estaba siempre más pálida y a veces con aspecto tumefacto.

El perro M 1, que fué sacrificado a los 249 días de diabetes, tenía varios pequeños cálculos fosfáticos en ambas pelvis renales.

Los Dres. Di Pietro y Cardeza han estudiado histológicamente nuestro material. En el período agudo predominaron las lesiones tubulares degenerativas agudas. En 12 perros, a los 2 a 8 días de recibir 75 mg/kg, a veces 50 mg/kg, se hallaron las lesiones siguientes: a) *necrosis de coagulación* aguda tóxica, que puede ser casi total como en la intoxicación mercurial o bien limitada; predomina en los tubos contorneados y puede tomar el asa de Henle; en algunos casos se observan cilindros hialinos en la luz de los tubos; b) *degeneración albuminosa* tubular, con dosis menores y cuando hay menor lesión; c) *infiltración o degeneración grasa*, de algunos o la mayor parte de los tubos contorneados, en

casi todos los casos las células presentan vacuolas grasosas; d) *hemosiderina*, en 3 casos con tatuaje pigmentario del epitelio. Los glomérulos estaban congestionados y grandes. En algunos casos existía edema intersticial.

En 11 perros, que vivieron de 9 a 134 días se comprobó una evolución regresiva de la nefrosis tóxica aguda. Con 40 mg/kg el riñón estaba normal o con poca lesión. Con dosis mayores había en grado variable, degeneración albuminosa o necrosis de coagulación o infiltración grasa, pero estas lesiones eran más discretas que las de los casos precedentes. Los glomérulos estaban congestionados o normales (1 vez) o con exudado grumoso en la cápsula de Bowman (4 casos). En 3 casos había edema e infiltración celular del estroma. Todos estos 11 animales presentaban diabetes intensa desde la inyección del aloxano.

De los dos experimentos de acumulación de dosis (Tabla 3), el perro Pa murió a los 3 días de recibir 200 mg/kg con diabetes, hepatitis aguda e ictericia, con necrosis aguda de los tubos renales. El perro Pb después de 150 mg/kg no presentó diabetes ni síntomas; fué sacrificado y se hallaron pocas lesiones de los túbulos renales.

Algunos animales urémicos tuvieron vómitos, diarrea sangui-nolenta; en uno hubo prolapso rectal. En un caso la mucosa gástrica tenía color rojo oscuro y presentaba pequeñas hemorragias submucosas y varias ulceraciones sangrantes minúsculas en la zona prepilórica; el contenido gástrico estaba teñido por la sangre.

Estas lesiones observadas en los riñones son semejantes a las descritas por Goldner y Gomori (1943-1944) y por Brunschwig y Allen (1945). Estos investigadores hallaron necrosis de los tubos contorneados con calcificación de algunos de ellos, semejantes a las de la intoxicación mercurial. Había depósito de glucógeno en el asa del Henle y algunos tubos contorneados y depósito de grasa en muchos de ellos.

*Alteraciones hepáticas.* — Con dosis de 100 mg/kg y sobre todo de 150 a 200 mg/kg se observó generalmente una ictericia intensa y la muerte al cabo de 3 a 4 días. Ejemplo de ello es el perro Pa, cuyo plasma contenía: bilirrubina, 22,5 mg en 100 ml; bilirrubina cloroformo-soluble, 2 mg por 100 ml; bilirrubina éter-soluble, 0; colesterol, 345 mg/100 ml; fosfolípidos, 560 mg en 100 ml; fósforo inorgánico, 46 mg/100 ml; reacción de Hanger posi-

tiva floculación del oro y Mc.Lagan negativas (análisis del Dr. López García). Histológicamente existía una hepatitis con alteraciones hepatocíticas intensas y grandes necrosis centro-lobulillares. El estudio de la función hepática en la diabetes aloxánica ha sido realizado en varios animales por los Dres. Biasotti y Cánepa, que publicarán sus resultados. El Dr. Banfi halló aumento neto y transitorio de profrombina en dos perros.

Con dosis menores (75 a 50 mg/kg) no se observó ictericia al principio. La bilirrubina total osciló entre 0,4 y 1,5 mg/l. Sólo en 2 de los muchos animales inyectados se observó una ictericia intensa al cabo de 38 y 64 días de recibir 50 mg/kg, es decir en un período final de su diabetes; esta ictericia tardía es imputable a la evolución de la diabetes y no al aloxano.

En la autopsia de los animales muertos después de 5 a 12 días de recibir el aloxano se encontró el hígado graso en todos los perros, especialmente en los períodos avanzados de la diabetes. El hígado era netamente amarillento, delimitándose los lobulillos por un fino anillo rojo y siendo su centro amarillo, en el que a veces se destacaba un vaso centrolubillar. En el perro sacrificado a los 249 días el peso corporal era de 7,2 kg y el del hígado 400 g con el aspecto citado que parecía granuloso, aunque el examen microscópico no reveló cirrosis sino una degeneración grasa centrolubulillar.

El examen microscópico fué practicado por los Dres. Cardeza y Di Pietro. En los animales muertos con diabetes y uremia, entre los 3 y 5 días después de recibir el aloxano, se halló infiltración grasa de los hepatocitos, que estaban aumentados de volumen. Entre los que murieron entre 6 y 9 días después de la inyección, sólo en un caso el hígado parecía normal, en uno había infiltración grasa y en 4 había zonas de degeneración grasa en el centro de los lobulillos. En uno de ellos había necrosis de algunas células en las zonas centrolobular. En estos animales se halló generalmente una hinchazón apreciable de las células de Kupffer.

Desde los 15 días en adelante se halló constantemente una neta degeneración grasa centrolubulillar, en los 11 casos estudiados. La zona de degeneración fué extendiéndose con el tiempo hacia la periferia del lóbulo. En ella se hallaban células con picnosis nuclear. De los animales que vivieron diabéticos desde 40 hasta 249 días después de la inyección de aloxano, la degeneración grasa

centrolobulillar abarcaba zonas extensas, las que se observaron en 6 de los 8 casos estudiados; en algunos de los perros que vivieron diabéticos más tiempo (54, 64, 134 y 249 días), la degeneración se extendía a la mayor parte del lobulillo y del órgano.

Estas lesiones son semejantes a las que describen Goldner y Gomori (1943-1944) y consisten: en áreas irregulares de extrema infiltración grasa y en su periferia muchas células con grupos picnóticos o fragmentados. Las lesiones variaron desde la hepatitis serosa leve hasta la necrosis franca y degeneración grasa. Desde la segunda semana se observó una extrema degeneración grasa medio zonal o central.

Dos de nuestros perros recibieron varias veces dosis de aloxano. El perro Pb (Tabla 3) resistió aún a 150 mg/kg sin tener diabetes ni ictericia; al sacrificarlo se halló una infiltración grasa discreta del hígado, tumefacción de las células de Kupffer y falta de alteraciones nucleares de los hepatocitos. El perro Pa (Tabla 3) resistió aún a 150 mg/kg, pero con 200 mg/kg murió a los 3 días con diabetes e ictericia intensa; se hallaron lesiones agudas y crónicas: a) las primeras consistían en una necrosis aguda tóxica centrolobulillar; b) las segundas en una proliferación de los conductillos biliares con esclerosis difusa periportal y atrofia de algunos hepatocitos; es decir que existía en él una cirrosis en comienzo.

*Otras lesiones.* — Algunos perros inyectados con 100 a 200 mg/kg murieron de edema pulmonar agudo. En más de veinte perros inyectados con dosis menor (40 a 75 mg/kg) se observaron diversas alteraciones pulmonares, como ser: manchas congestivas o equimóticas, zonas de hepatización roja, al cabo de 2 a 13 días, y tres veces, bronconeumonía. En un perro inyectado con 200 mg/kg había hepatitis, ictericia, uremia y mucho líquido pleural transparente. Las lesiones pulmonares han sido señaladas por Brunschwig y Allen (1944), Grande Covian y Oya (1944), Housay, Orías y Sara (1945) en el perro, y por Peralta (1945) en el gato. En un solo perro, muerto antes de las 24 horas de recibir 40 mg/kg, se hallaron trombosadas la arteria pulmonar y las venas cavas.

No se observaron alteraciones macroscópicas de la tiroides, suprarrenal, pleura o peritoneo. Un solo perro murió de pleuresía purulenta bilateral a los 10 días de diabetes aloxánica.

*Acción sobre el feto.* — Una perra recibió de 10 en 10 días 50 mg/kg de aloxano 2 veces y luego 75 mg/kg. Las primeras dosis no produjeron hiperglucemia, pero la última la dejó diabética. Cuatro días después de esa inyección parió dos cachorros vivos. Uno murió al día siguiente y otro fué sacrificado a las 48 horas, siendo su glucemia 0,52 g/l. Los islotes de Langerhans de los fetos eran escasos, pero de aspecto normal y contenían células  $\alpha$  y  $\beta$  con sus gránulos típicos.

#### DISCUSION

Por acción del aloxano la glucemia se modifica siguiendo 3 fases o etapas consecutivas.

La primera fase es de hiperglucemia y dura entre 1 y 5 horas, con el máximo habitualmente a las 2 a 3 horas. Depende del hígado y no son esenciales ni la suprarrenal ni el simpático, en el perro <sup>(1)</sup>. No se produce si se ha extirpado el hígado (Houssay, Orías y Sara, 1945) y tampoco se observa en el conejo eviscerado (Corkill, Fantl y Nelson, 1944; confirmamos en el perro). Se debe al parecer a una acción directa del aloxano sobre el hígado; aunque Peralta (1945) cree que parecen intervenir los nervios del hígado, porque en la mayoría de los gatos no apareció la hiperglucemia después de cortar los nervios del hilio del hígado.

La elevación inicial de la glucemia no depende esencialmente ni de la adrenalina ni del simpático, puesto que la hiperglucemia se ha observado después de extirpar o excluir las suprarrenales en el perro (Houssay, Orías y Sara, 1945), y el gato (Peralta, 1945) o de cortar los espláncnicos mayores y menores (Houssay, Orías y Sara, 1945). Además, en experimentos inéditos, con el método de anastomosis suprarrenoyugular (Houssay y Rapela), se comprobó que la inyección venosa de aloxano (80 mg/kg) elevó la presión arterial, pero no produjo descarga de adrenalina en 4 casos. El extracto de cornezuelo de centeno impide la acción hiperglucemiante inicial del aloxano (Grande Covian y de Oya, 1944), quizás por su acción directa sobre el hepatocito.

En ocho perros con hipofisectomía total faltó la fase hiperglucémica inicial y murieron en pocas horas en hipoglucemia; en los

---

(1) En la rata suprarrenopriva falta la hiperglucemia inicial.



que tenían hipofisectomías incompletas hubo reacciones variables parecidas a las de los normales (De Oya y Grande Covian, 1946). En las ratas hipofisoprivas el alexano produjo hiperglucemias iniciales, pero subnormales, e hipoglucemia secundaria marcada (Martínez, resultados inéditos). Por otra parte, las células  $\beta$  de los islotes se lesionan en las ratas hipofisoprivas. En el sapo hipofisoprivo el aloxano produce hiperglucemia inicial.

La segunda fase de la acción del aloxano es de hipoglucemia que llega generalmente a su nivel más bajo entre las 8 y 10 horas. No se debe a liberación de insulina, puesto que se observa la hipoglucemia cuando se inyecta el aloxano a un perro pancreatoprivo desde media hora antes (Houssay, Orías y Sara, 1945); en cambio falta casi siempre la hipoglucemia si son pancreatoprivos desde 24 horas o más tiempo (Goldner y Gomori, 1944; Ridout, Ham y Wrenshall, 1944; Houssay, Orías y Sara, 1945; De Oya y Grande Covian, 1945). Es probable que la hipoglucemia se deba a una menor formación de glucosa en el hígado. El vago y la atropina parecen ejercer una influencia cuyo significado no está aclarado. Así, la inyección de atropina impide la fase hipoglucémica y hace más leve y menos duradera la diabetes o evita su producción por dosis bajas de aloxano (Grande Covian y De Oya, 1945). La sección previa de los vagos y parte inferior de las cadenas simpáticas torácicas retrasa la hipoglucemia hasta las 12 y 16 horas y persiste a las 24, retrasándose la aparición de la hiperglucemia (Shipley, Rannefeld y Beyer, 1945). En el perro no existe el peligro de muerte en esta fase, mientras que es habitual en el conejo si no se le administra glucosa.

La tercera y última fase es de hiperglucemia permanente o a veces pasajera, que se debe principalmente a las lesiones degenerativas de las células  $\beta$  de los islotes lesionadas selectivamente por el aloxano. La hiperglucemia es apreciable al cabo de 24 horas en 60 % de los que quedan diabéticos o aparece a las 48 horas en 24 %. La lesión de los islotes la precede, pues existe ya durante la segunda fase. Con el injerto del duodeno-páncreas al cuello de pancreatoprivos de 24 horas, se comprobó que los páncreas de los animales inyectados con aloxano no segregaba insulina al cabo de 24 horas (5 sobre 6 casos) y tampoco cuando los animales estaban ya diabéticos desde 4 a 63 días (6 casos); en dos animales la secreción de insulina no era apreciable a pesar de que uno

(a las 24 horas) estaba todavía hipoglucémico y el otro (a los 5 días) tenía 1,24 g/l de glucemia. Este método de injerto del páncreas indica una fuerte disminución de la secreción de insulina, pero no revela las disminuciones pequeñas. Desde las 24 horas de inyectar aloxano se halla una fuerte disminución del contenido en insulina del páncreas (Goldner y Gomori, 1944; Ridout, Ham y Wrenshall, 1944).

En algunos animales el ascenso inicial de la glucemia es mayor que el que suele observarse después de la pancreatectomía, lo que ha hecho pensar que el hígado participa en forma especial en la producción de esta hiperglucemia.

Es interesante que las células  $\beta$  no presentan en el perro una necrosis de coagulación profunda como se observa en el conejo. En el perro, las células  $\beta$  se desgranulan y se achican, presentando alteraciones nucleares. Luego, durante la diabetes, van desapareciendo paulatinamente, desde el cuarto día, de modo que alrededor de los 8 días hay 50 % de células  $\alpha$  y  $\beta$ . Al cabo de algunas semanas se encuentran los islotes achicados, por desaparición casi total de las células  $\beta$  y conservación de las células  $\alpha$ . En cierto número de animales se produce más tarde un agrandamiento de los islotes por aumento de las células  $\alpha$ . Esta regeneración es más precoz y neta en la rata que en el perro.

La velocidad de inyección del aloxano tiene gran importancia. Esta substancia actúa bruscamente a alta concentración, pero desaparece de la sangre en pocos minutos (Leech y Bailey, 1945). Si se excluye por pinzamiento una parte del páncreas durante 1 a 6 minutos, se observa que no se lesionan los islotes al soltar las pinzas (Gomori y Goldner, 1945). La inyección debe ser muy rápida, en 20 a 40 segundos, para que su eficacia sea segura. Conviene hacerla por la safena y no la yugular, para disminuir el peligro de las lesiones pulmonares.

Las dosis elevadas (100 a 200 mg/kg) matan por: a) edema pulmonar; b) hepatitis aguda con ictericia; c) uremia. La dosis de 75 mg/kg producen diabetes urémica, con aumento paulatino de nitrógeno no proteico, muriendo la mayor parte de los animales en uremia. La dosis de 50 mg/kg provoca la diabetes en 79 % de los perros y la de 40 mg/kg en casi un 45 %. Con estas dosis el aumento de nitrógeno no proteico es generalmente pasajero y falta a veces. Esta diabetes es pasajera o permanente; el número

de diabetes pasajeras aumenta al disminuir las dosis de aloxano o cuando las inyecciones se hacen lentamente o en las diabetes por reinyecciones.

La dosis de aloxano que provoca la diabetes no es modificada por la reducción quirúrgica de la masa del páncreas, al revés de lo que pasa con las diabetes metahipofisaria y metatiroidea. El aloxano obra con una sola dosis, por su concentración, pues su acción se produce en un instante y luego evoluciona con el tiempo. En cambio, las otras sustancias (ánterohipófisis o tiroides) obran por efecto acumulativo, por eso su acción debe repetirse muchas veces y es favorecida por la glucosa.

La diabetes aloxánica se produce en perros privados de la medula suprarrenal o la tiroides y paratiroides. No es prevenida porque se inyecte el aloxano durante una hipoglucemia por insulina o floridzina (Goldner y Gomori, 1944; confirmamos) o durante una hiperglucemia por administración de glucosa.

Pueden observarse efectos de acumulación o de acostumbramiento, según sea la frecuencia de las inyecciones. Los primeros se observan inyectando 40 mg/kg diarios, varios días seguidos. Los segundos inyectando una dosis progresivamente creciente a cada semana de intervalo. Se ha descrito que una inyección de aloxano puede ser poco o nada activa sobre la glucemia en el perro (De Oyan y Grande Covián, 1945) o en la rata (Foglia, Orías y Sara, 1944), que recibieron antes una inyección de aloxano.

La diabetes provocada por el aloxano es una diabetes meta-aloxánica o sea que el aloxano lesiona en un instante a los islotes y ya no obra más. Es una diabetes por lesión de las células  $\beta$  y con conservación de las células  $\alpha$  y del resto del páncreas. Demuestra en forma elegante y precisa que las células  $\beta$  son las que producen la secreción interna del páncreas que mantiene normal el metabolismo de los hidratos de carbono y cuya falta produce la diabetes.

La intensidad de la diabetes es variable. En general en nuestros experimentos, fué al principio menor que la de la diabetes pancreática y luego evolucionó con una agravación lenta y progresiva. En cambio, Throgood y Zimmermann (1945) la hallaron más intensa que la diabetes pancreática y observaron que su intensidad disminuía con la pancreatectomía. También Candela (1946) observó menor necesidad de insulina después de extirpar el páncreas.

Hubo hiperglucemias que oscilan entre 1,8 y 4,5 g/l. La glucosuria diaria osciló entre 0,9 y 2,8 g/kg día. El nitrógeno urinario entre 0,4 y 1,3 g/kg/día. La relación glucosa nitrógeno osciló entre 2 y 2,7. Los cuerpos cetónicos excretados por la orina variaron entre 1 y 211 mg/kg/día, en general entre 10 y 50 mg/kg/día. La poliuria fué generalmente moderada y no constante. La polidipsia y la polifagia eran poco marcadas y la caída del peso era lenta. La supervivencia fué variable, habiéndose sacrificado a un animal con más de ocho meses de diabetes metaaloxánica.

Una de las características principales de la diabetes metaaloxánica, es la larga duración de la vida de muchos animales y la lenta caída del peso corporal. Es probable que esto se deba a que el catabolismo proteico y la cetosis no son exageradas.

El metabolismo basal sube pasajeraamente por acción del aloxano, aunque no haya diabetes, pero es además supernormal si existe diabetes. Las sustancias minerales del plasma muestran aumento del fósforo inorgánico si hay hiperglucemia y ligeros descensos de cloro o sodio.

La administración de glucosa por inyección endovenosa muestra curvas hiperglucémicas típicas de la diabetes. Las han observado otros autores dando glucosa por boca (Goldner y Gomori, 1943; Carrasco Formiguera, 1944), en una o dos tomas (Grande Covián y De Oya, 1943-1945).

La sensibilidad a la insulina fué considerada normal por Goldner y Gomori (1944). Candela (1946) ha observado que la necesidad de insulina de los perros con diabetes aloxánica disminuye si se les extirpa luego el páncreas, por lo que discute la posibilidad de que el páncreas produzca una influencia que disminuye la acción insulínica.

En nuestros experimentos, la sensibilidad a la insulina (1 unidad/kg endovenosa) de los perros con diabetes aloxánica se asemeja a la de la diabetes metatiroidea. El descenso producido es variable, en general mayor que en los testigos, tanto en cifras absolutas como en por ciento del valor inicial.

Al tratamiento por insulina reaccionan los animales en forma variada, pero en general resulta difícil mantener a estos animales aglucosúricos y normoglucémicos. Con 1 a 3 unidades/kg/día de insulina hubo 8 muertes en hipoglucemia, 5 con esteatonecrosis y

1 en uremia. En estos animales la glucemia descendía con el tratamiento.

Hubo 3 casos de curación de la diabetes aloxánica por un tratamiento precoz, con insulina. También se obtuvo, un poco más fácilmente, por un tratamiento por floridzina (datos a publicarse). Esto es posible porque las células  $\beta$ , aunque algo alteradas desde el principio, sólo se van destruyendo con el tiempo. Evitando la hiperglucemia, mediante la insulina o la floridzina, se evita en parte que sigan lesionando las células  $\beta$ .

El tratamiento por insulina fué incapaz de curar la diabetes de otros 4 perros. Aun cuando llegaban a la normoglucemia, volvían a la hiperglucemia a los pocos días de cesar la insulina. La lesión de células  $\beta$  estaba mejorada, pero no curada y además el número de células conservadas era demasiado escaso.

Dos perros fueron tratados tardíamente (a los 36 días de su diabetes) y mostraron fuerte resistencia a la insulina; su hígado era muy graso.

Las células  $\beta$  presentan picnosis, citoplasma achicado y desgranulación. Sin embargo, un tratamiento precoz por insulina o floridzina durante algunas semanas, permite que algunos animales vuelvan a la normoglucemia y las células  $\beta$  mejoren lentamente. Al principio de esta curación la glucemia es inestable y el animal puede recaer en el estado diabético si se le administra azúcar.

Después de una diabetes pasajera por aloxano, el páncreas queda sensible a la acción vulnerante de la tiroides. La administración tiroidea puede producir una diabetes metatiroidea, que no provoca si el páncreas es normal o el animal no reaccionó al aloxano inyectado. Estos resultados se expondrán en otro trabajo.

La acción pasajera del aloxano sensibiliza al páncreas para la acción diabetógena ulterior del extracto ánterohipofisario o de un exceso de azúcar en la dieta.

El aloxano es un tóxico que puede lesionar al pulmón, en grado variable al hígado y el riñón y fuertemente al páncreas. Las lesiones hepáticas y renales suelen ser reversibles y pasajeras si la dosis no es excesiva, mientras que las de los islotes del páncreas suelen ser irreversibles y progresivas.

Las dosis elevadas (100 a 200 mg/kg) provocan edema pulmonar agudo. Las dosis algo menores, sobre todo en inyección yugular rápida, producen a veces manchas equimóticas, zonas de

congestión con o sin edema. Estas lesiones pulmonares por lesión de los capilares han sido observadas ya antes (Brunschwig y Allen, 1944; Grande Covián y De Oya, 1944; Goldner y Gomori, 1944; Houssay, Orías y Sara, 1945; Peralta, 1945).

En el riñón se observan lesiones acentuadas con dosis altas (75 a 10 mg/kg) y variables o escasas o nulas con dosis menores (50 ó 40 mg/kg). En su grado más intenso hay necrosis de coagulación de los tubos contorneados, como en la intoxicación mercurial. En grados menores hay tumefacción turbia más o menos neta, infiltración grasa, depósito de glucógeno en el ansa de Henle.

En el hígado, las dosis elevadas (100 a 200 mg/kg) producen degeneraciones intensas centrolobulillares o de la mayor parte del lobulillo, con una ictericia muy intensa. Con dosis menores hay grados variables de homogeneización del citoplasma o de alteraciones nucleares del hepatocito, a menudo leves y que pueden faltar; es frecuente una infiltración grasa del hepatocito y también una tumefacción de las células de Kupffer. En caso de diabetes se observa una degeneración grasa centrolobulillar que crece progresivamente con la duración de la sobrevida. Sólo en un perro con varias reinyecciones se observó una cirrosis en comienzo.

En el páncreas se observan lesiones degenerativas selectivas de las células  $\beta$ , las que luego se van destruyendo paulatinamente. Al final los islotes están constituidos exclusivamente o casi exclusivamente por las células  $\alpha$  conservadas o neoformadas. En caso de diabetes hay vacuolación del epitelio de los canales, al cabo de algunas semanas.

Se ha observado a simple vista e histológicamente en 22 % de los perros inyectados con aloxano, la aparición de esteatonecrosis. Esta es precedida o acompañada por una pancreatitis con edema e infiltración celular. Es muy característica la lesión del epitelio de los canales y a veces la destrucción de algún punto de su pared, con salida de líquido al tejido pancreático vecino.

#### RESUMEN Y CONCLUSIONES

La inyección endovenosa de aloxano produce una modificación trifásica de la glucemia: 1º) hiperglucemia, 2º) hipoglucemia, 3º) hiperglucemia. En esta última fase se observa una diabetes permanente o pasajera, que se debe fundamentalmente a lesiones

degenerativas selectivas de las células  $\beta$ , las que van destruyéndose paulatinamente en las semanas siguientes hasta desaparecer del todo o casi del todo. Las células  $\alpha$  se conservan y a veces aumentan a la larga. La acción del aloxano depende de su concentración en la sangre, por lo que la inyección debe ser endovenosa y rápida. La acción no es modificada por un estado hipoglucémico (insulina o floridzina) o hiperglucémico (glucosa) inicial, ni por la pancreatectomía subtotal o tiroidectomía o tiroparatiroidectomía o desmedulización suprarrenal previas.

Las dosis altas pueden matar por edema pulmonar o por hepatitis aguda con ictericia o uremia por necrosis de coagulación de los tubos contorneados. Con dosis menores los trastornos hepáticos o renales son a menudo leves y pasajeros, pero las lesiones de los islotes suelen ser indelebles.

Se pueden observar fenómenos de acumulación repitiendo diariamente dosis subliminales. En cambio, con dosis crecientes una vez por semana, se produce generalmente un aumento de resistencia.

La intensidad de la diabetes es variable. En general es mediana y luego se intensifica paulatinamente con el tiempo. Hay hiperglucemia, glucosuria, cetonuria, moderada poliuria y polifagia. La duración de la vida puede ser larga y pasar los ocho meses de diabetes. La sensibilidad a la insulina es semejante a la de la diabetes metatiroidea. El aloxano aumenta pasajeramente al metabolismo basal y durante la diabetes suele estar aumentado. La diabetes aumenta al fósforo inorgánico del plasma. La inyección de glucosa produce curvas hiperglucémicas típicas de la diabetes. A la larga el hígado diabético presenta degeneración grasa centrolobulillar.

Se ha observado pancreatitis y esteatonecrosis a simple vista en 20 % e histológicamente en 22 % de los perros inyectados con aloxano.

#### SUMMARY AND CONCLUSIONS

Intravenous injection of alloxan produces a three stage variation in the blood sugar: 1) hyperglycemia, a) hypoglycemia and 3) hyperglycemia. In the last phase a permanent or transient diabetes occurs which is fundamentally due to selective degeneration

of the  $\beta$  cells which are gradually destroyed during the following weeks until all or nearly all have disappeared. The  $\alpha$  cells show no alteration as a rule although in some cases after a certain time they increase in number. The activity of alloxan depends on its concentration in the blood so it must be injected rapidly intravenously. Initial hypoglycemia (insulin or phloridzin) or hyperglycemia (glucose) does not alter the action of alloxan. Previous subtotal pancreatectomy, thyroidectomy, thyro-parathyroidectomy, or extirpation of the adrenal medulla also have no effect on the action of alloxan.

High doses can produce death by pulmonary oedema, acute hepatic lesions with jaundice or uremia due to coagulation necrosis of the renal tubules. With smaller doses the hepatic and renal lesions are frequently slight and transitory but the alterations in the islets are usually permanent.

A cumulative effect can be observed by giving daily subliminal doses. On the other hand weekly injections of progressively increasing doses usually provoke resistance.

The intensity of the diabetes is variable, generally it is not very severe at the beginning but later it gradually increases. There is hyperglycemia, glycosuria, ketonuria, moderate polyuria and polyphagia. Animals may survive a long time and suffer diabetes for more than 8 months. Sensibility to insulin is similar to that found in metathyroidal diabetes. Alloxan increases the basal metabolism for a short time and again during the diabetic stage there is a high basal metabolism. There is an increase of inorganic phosphorus in the blood plasma. Glucose injection is followed by a typical diabetic hyperglycemia curve. With time the diabetic liver shows central fatty degeneration of the cells.

Pancreatitis and steato-necrosis has been observed in 20 % macroscopically and in 26 % on microscopic examination, of the alloxan injected dogs.

#### BIBLIOGRAFIA

(Todos los trabajos son de acción del aloxano sobre el perro, menos los numerados 1, 11, 12, 16, 17, 18, 19, 28, 29 y 30)

1. Artundo A.: Rev. Soc. Argent. Biol., 1930, 6, 497. — 2. Brunschwig A., Allen J. G.: Cáncer Research., 1944, 4, 45. — 3. Brunschwig A., Allen J. G., Goldner M. J., Gomori G.: J. Amer. Med. Ass., 1943, 122, 966. — 4. Candela J. L. R.: Rev. Clín. Esp., 1945, 19, 326. — E. Candela J. L. R.:



- Rev. Clín. Esp., 1945, 19, 393. — 6. Carrasco-Formiguera R.: Bol. Biol. Univ. Puebla, 1943, 2, 5. — 7. Carrasco-Formiguera R.: Bol. Bial. Univ. Puebla, 1944, año II, N° 7-8, 27. — 8. Carrasco-Formiguera R.: J. Lab. Clín. Méd., 1944, 29, 510. — 9. Carrasco-Formiguera R.: J. Amer. Med. Ass., 1945, 127, 482. — 10. Carrasco-Formiguera R., Mendoza Ortiz E., López Pinto J.: Bol. Biol. Univ. Puebla, 1944, año III, N° 9-10, 3. — 11. Corkill A. B., Fantl P., Nelson J. F.: Med. J. Austr., 1944, 31, 285. — 12. De Finis M. L., Houssay B. A.: Rev. Soc. Argent. Biol., 1943, 19, 94. — 13. De Oya J. C., Grande Covián F.: Rev. Clín. Esp., 1945, 16, 412. — 14. De Oya J. C., Grande Covián F.: Rev. Clín. Españ., 1945, 17, 160. — 15. De Oya J. C., Grande Covián F.: Rev. Clín. Españ., 1946, 20, 33. — 16. Foglia V. G., Orias O., Sara J. G.: Rev. Soc. Argent. Biol., 1944, 20, 440. — 17. Goldner M. G., Gomori G.: Endocrinology, 1943, 33, 297. — 18. Goldner M. G., Gomori G.: J. Amer. Med. Ass., 1944, 124, 802. — 19. Goldner M. G., Gomori G.: Proc. Amer. Diabet. Ass., 1944, 89. — 20. Gomori G., Goldner M. G.: Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1945, 58, 232. — 21. Grande Covián F., De Oya J. C.: Rev. Clín. Españ., 1944, 15, 262. — 22. Grande Covián F., De Oya J. C.: Rev. Clín. Españ., 1945, 17, 9. — 23. Grande Covián F., De Oya J. C.: Rev. Clín. Españ., 1945, 17, 320. — 24. Houssay B. A.: Rev. Soc. Argent. Biol., 1944, 20, 179. — 25. Houssay B. A., Foglia V. G.: Rev. Soc. Argent. Biol., 1944, 20, 247. — 26. Houssay B. A., Foglia V. G., Smyth F. S.: Rev. Soc. Argent. Biol., 1941, 17, 46; J. Exp. Med., 1941, 74, 283. — 27. Houssay B. A., Orias O., Sara J. G.: Rev. Soc. Argent. Biol., 1945, 21, 30; Science, 1945, 102, 197. — 28. Kepinov L., Ledebt-Petit Dutailis S.: C. R. Soc. Biol., 1927, 97, 25. — 29. Leech R. S., Bailey C. C.: J. Biol. Chem., 1945, 157, 525. — 30. Peralta B.: Rev. Inst. Salubr. Enferm. Tropic. (México), 1945, 6, 117. — 31. Ridout J. H., Ham A. W., Wrenshall G. A.: Science, 1944, 100, 57. — 32. Shipley E. G., Rannefeld A., Beyer K. H.: Feder. Proc. 1945, 4, 64. — 33. Suárez Soto V.: Bol. Biol. Univ. Puebla, 1943, año II, N° 6, 21. — 34. Suárez Soto V.: Bol. Biol. Univ. Puebla, 1944, año III, 63. — 35. Thorogood E., Zimmermann B.: Endocrinology, 1945, 37, 191.